

別紙 1

## 論文審査の要旨

報告番号	㊦・乙 第 2966 号	氏 名	栗谷 未来
論文審査担当者	主査 教授 上條 竜太郎 副査 教授 山本 松男 副査 教授 美島 健二		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Anti-mouse RANKL Antibodies Inhibit Alveolar Bone Destruction in Periodontitis Model Mice」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>障がい者は自己による口腔管理が困難であるため、歯周病の発症リスクが高く、患者によっては炎症性歯槽骨破壊が進行する。従って、機械的な口腔清掃が困難な症例に対し、薬物を用いた歯槽骨破壊抑制方法の開発は重要である。骨吸収抑制薬であるデノスマブは、破骨細胞分化誘導因子である RANKL を分子標的とする完全ヒト型モノクローナル抗体製剤であり、骨粗鬆症や骨転移を伴う癌などの治療に適応している。しかし、現在のところ歯周病に伴う歯槽骨破壊の治療には使用されておらず、その効果は不明である。そこで本研究では、デノスマブが歯周病に伴う骨破壊の抑制に有効か否かを明らかにするため、2 種類の炎症性骨破壊モデル動物すなわち、Lipopolysaccharide (LPS) 誘導性頭蓋骨炎症モデルと歯周病モデルを用いて検討した。</p> <p>その結果、LPS 誘導性頭蓋骨炎症モデルでは、LPS により破骨細胞形成および骨破壊が促進されたが、抗 RANKL 抗体はこれらを抑制した。ゾレドロネートは骨破壊を抑制したものの、破骨細胞形成は抑制しなかった。一方、大腿骨の骨量変化は認められなかったことから、頭蓋骨に投与した薬物の作用が局所的であることが確認された。また、歯周病モデルでは 1 週間以内に歯槽骨の破壊とそれに伴う歯根露出が認められたが、抗 RANKL 抗体はそれを強力に抑制した。一方、ゾレドロネートは抗 RANKL 抗体に比べて歯槽骨破壊に対する抑制作用が弱く、歯根露出を防げなかった。この時、ゾレドロネートは大腿骨の骨量を抗 RANKL 抗体と同等に増加させたことから腹腔に投与した薬物の作用が全身的であることが確認された。以上より、デノスマブはゾレドロネートよりも歯周病に伴う歯槽骨破壊に対する抑制作用に優れており、ブラッシングなどの自己による口腔清掃が困難な症例に対し、デノスマブが有効であることが示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の山本委員および美島委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p><b>山本委員の質問とそれらに対する回答：</b></p> <p>1. 大腸菌由来 LPS と <i>P.g</i> 菌由来 LPS の違い、本実験で大腸菌由来 LPS を選択した理由について説明せよ：歯周病を想定するのであれば <i>P.g</i> 菌を用いる実験が必須である。しかし頭蓋骨での骨破壊実験の多くは大腸菌由来 LPS を用いている。本実験ではまず、それらの過去の論文と比較するために大腸菌由来 LPS を用いることとした。さらに <i>Escherichia coli</i> 026 : B6 由来 LPS (Sigma) がヒト PBMC、マウス骨髄樹状細胞およびラット星状細胞でのサイトカイン分泌を誘導することは確認されており、過去に多用されているため、本実験ではこの菌株を選択した。しかし、ハイドロキシアパタイトをコーティングしたスライドを用い、骨吸収窩を測定した実験において、<i>P. gingivalis</i> および <i>E. coli</i> 由来の LPS の吸収面積を比較すると <i>P. gingivalis</i> 由来の LPS の群で、<i>E. coli</i> 由来の LPS に比べ 1.4 倍の吸収面積の値を示したという報告がある。従って今後、<i>P.g</i> 菌由来 LPS による歯槽骨破壊モデルにおいても抗 RANKL 抗体の作用</p>			

を検討する必要がある。

2. デノスマブの多臓器での局在や副作用を説明せよ：過去の報告では、投与後 56 日目までに 77.9%が尿中に排泄され、残りは腋窩・鼠径リンパ節、脾臓で血清中よりも高濃度で検出されている。デノスマブは血液中を循環し、リンパ節や脾臓の T 細胞などの RANKL に結合するものの骨への特異性は低いと考えられる。副作用として、デノスマブを投与されているがん患者での顎骨壊死発生頻度は 2%以下、と報告されており、ビスホスホネートによる顎骨壊死との間で有意差は認められていない。また、妊娠マウスに抗 RANKL 抗体を投与すると胎児の死亡や母親の乳腺発達障害等が生じることや、痙攣・テタニー・失明等知覚等の症状を伴う低カルシウム血症による死亡例も報告されている(安全性速報 2012 年 9 月：ランマーク®皮下注 120mg による重篤な低カルシウム血症について)ことから、デノスマブ・抗 RANKL 抗体にはまだ確認されていない副作用の可能性も考えられる。

#### 美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. 薬剤誘導性顎骨壊死と口腔清掃状態の関連が注目されているが、今回の研究ではどのような配慮がなされていたか説明せよ：骨吸収抑制薬による薬剤誘導性顎骨壊死は以前より報告されているが、口腔清掃状態の向上により顎骨壊死の発症率が減少したという報告もある。今回用いたマウス頭蓋骨破壊モデルでは、口腔清掃状態が不良であることを想定し、LPS による細菌性の炎症性骨破壊を誘導した実験系を行った。本実験で、抗 RANKL 抗体が細菌性の炎症性骨破壊を抑制したことから、将来、歯周病の治療薬として有効である可能性が示唆された。
2. 既存薬を用いた歯周病の治療方法の開発として有望であると考えられるが、臨床応用に際しての課題について述べよ：局所投与方法の検討が必要であり、本実験で行ったコラーゲンゲル添加による局所滞留性の向上は、一つの方法として有効であることが示唆された。しかし本実験では、Post-treatment (発症後の治療)を想定した実験を行っていないため、今後は長期投与、投与間隔も含め検討すべきである。また、薬剤関連性顎骨壊死のリスクを検討するために、侵襲性の処置を行う実験も必要であると考えられる。骨粗鬆症治療薬として現在適用されているデノスマブの薬価は高額であるため、投与量や濃度の検討も課題として考えられる。

両副査は、上記を含めた質問に対する解答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

#### 主査 上條委員の質問とそれらに対する回答：

1. 骨吸収が確立してからのゾレドロネートと抗 RANKL 抗体の投与効果は確認したのか：確認していない。しかしご指摘のとおり、臨床における薬物療法を想定した場合は、骨吸収が確立してからのゾレドロネートと抗 RANKL 抗体の投与効果を検討することは極めて重要であり、今後検討すべき最も重要な課題と考え、現在 2 週間後の歯周病モデルマウスの腹腔内に抗 RANKL 抗体を投与して、歯周病発症後の薬剤投与の効果を検討中である。しかし、本実験モデルでは歯槽骨破壊が長期間継続されず治癒する傾向があるため、新しい実験条件、例えば絹糸に LPS や生きた菌を含有させて臼歯を結紮するなどの改良が必要である。また、骨吸収が確立してから後、骨破壊は抑制することが期待されるものの、骨量の増加はどれだけ期待できるか想定できていない。これは歯槽骨の代謝回転や組織学的特性に依存すると思われる。

主査の上條委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)